View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Tsukuba Repository

Load induced phenotype transition of skeletal muscle : contribution of the calcineurin signaling pathway

著者	宮崎 充功
内容記述	Thesis (Ph. D.)--University of Tsukuba, (A), no. 4123, 2006.3.24 Includes bibliographical references
発行年	2006
URL	http://hdl.handle.net/2241/18169

【291】

氏　名（本籍）	宮　﨑　充　功（静 岡 県） （みや ざき みつ のり）
学 位 の 種 類	博　　士（学　　術）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4123　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Load Induced Phenotype Transition of Skeletal Muscle** **-Contribution of the Calcineurin Signaling Pathway-** （骨格筋線維タイプの変化に対する負荷量の影響－カルシニューリンシグナル経路の関与－）

主　査	筑波大学教授	学術博士	西　平　賀　昭
副　査	筑波大学助教授	医学博士	大　森　　肇
副　査	筑波大学助教授	理学博士，博士（医学）	武　政　　徹
副　査	筑波大学講師	博士（体育科学）	前　田　清　司

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は，骨格筋線維タイプの変化におよぼす運動負荷量の影響とその制御機構について，カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを含むシグナル経路の関与を中心に検討が行われたものであり，以下の 3 つの研究課題により構成されている。

Study 1 では，運動負荷量の変化に対するマウス骨格筋の適応性について評価し，実験的骨格筋遅筋化モデルを確立することを目的に検討を行った。Study 2 では，運動負荷量の増大に伴う骨格筋遅筋化過程におけるカルシニューリン系シグナル経路の関与について検討を行った。Study 3 では，萎縮および速筋化したマウス骨格筋の回復過程（再成長および再遅筋化）におけるカルシニューリン系シグナル経路の関与について検討を行った。以下に，それぞれの研究課題の概要を記す。

Study 1: Effects of intensity and duration of endurance exercise on skeletal muscle fiber type transition in mice

骨格筋は使用性肥大／遅筋化，廃用性萎縮／速筋化といった変化を示す，非常に可塑性の高い組織の一つである。骨格筋線維タイプの多様性は，myosin heavy chain（MHC）をはじめ種々の骨格筋特異的タンパク質のアイソフォームにより識別され，これらの違いが収縮特性や代謝特性に影響を与える。これまでラットを用いた先行研究から，電気刺激や持久性運動により，骨格筋特異的タンパク質の遅筋化が引き起こされることが明らかとなっている。しかし，マウスを対象に行われた検討は非常に少なく，また，それらの結果は必ずしもラットの場合と一致するわけではない。遺伝子改変モデルを用いた多くの研究がマウスを実験動物として採用している現状を考慮すると，運動負荷に対するマウス骨格筋の適応性を評価することは極めて重要である。Study 1 では，運動負荷量の変化に対するマウス骨格筋の適応性について評価し，実験的骨格筋遅筋化モデルの確立を目的として検討を行った。実験条件は , 以下のように設定した。運動強度：15, 20, 25m/min，運動時間：30, 60, 90 min，運動頻度：7days/week，運動期間：4weeks。SDS-PAGE により MHC

isoform を分析した結果，前脛骨筋では運動強度および時間の増加に伴い MHC IIb が減少し，MHC IIa+d/x が増加した。また酸化的代謝能の指標としてクエン酸合成酵素活性を測定したところ，足底筋および前脛骨筋において増加が認められた。以上のことから, 本実験条件下の持久性運動により骨格筋遅筋化が誘発され，また，その変化は運動量の増加により促進されることが示唆された。

Study 2: Contribution of the calcineurin signaling pathway to overload-induced skeletal muscle fiber-type transition

神経筋活動パターンの変化に伴う遅筋線維特異的タンパク質の遺伝子発現を引き起こすメカニズムとして，カルシニューリンを介したシグナル経路の関与が提唱されている。カルシニューリンは，slow type の神経発火パターンに伴う骨格筋細胞内カルシウム濃度の持続的上昇により活性化され，Nuclear Factor of Activated T cell（NFAT）や Myocite Enhancer Factor 2（MEF2）などの転写因子を介して，遅筋線維特異的タンパク質の遺伝子発現を制御するとされている。しかしながら，生体内における骨格筋遅筋化に対するカルシニューリンおよびその下流因子の関与については，発現動態の変化を含め，詳細は不明な点が多い。Study 2 では，マウス足底筋を対象に代償性過負荷による骨格筋遅筋化モデルを適用し，またカルシニューリン特異的阻害薬である FK506 の投与を行うことで，骨格筋遅筋化過程におけるカルシニューリンシグナル経路の関与について検討を行った。方法は，ICR 系マウスを対象に，共働筋切除による足底筋への代償性過負荷およびカルシニューリン特異的阻害薬の投与（FK506, 3-5 mg/kg/day）を施した。飼育期間は 4 週間とし，MHC isoform およびカルシニューリン系シグナル経路の各転写因子の発現レベルを分析した。その結果，過負荷群では MHC I の新たな発現や MHC IIa+d/x の増加，MHC IIb の減少など，明らかな骨格筋遅筋化を示した。一方 FK506 を投与した場合，いずれの MHC isoform にも変化はなかった。このことから，過負荷に伴う骨格筋線維タイプの変化には，明らかにカルシニューリン系シグナル経路が関与していることが示された。また，収縮活動量の増加に伴う各因子の発現動態について検討したところ，カルシニューリンおよびその下流因子である MEF2D は，負荷開始 1 － 2 日後に一過性の著名な発現量増加を示し，4 日後には定常状態に達した。また NFAT2 に関しては，負荷開始 7 日後に発現量のピークを示し，14 日後にはコントロールレベルに低下した。以上のことから，収縮活動量の増加に伴い，カルシニューリン系シグナル経路は一過性に特異的な発現パターンを示すことが明らかにされた。

Study 3: Calcineurin mediated slow-type fiber expression and growth in reloading condition

遅筋線維特異的タンパク質の遺伝子発現制御に加え，インスリン様成長因子に起因した骨格筋細胞の肥大制御機構についても，カルシニューリン系シグナル経路の関与が示されている。しかし，生体における骨格筋肥大に対するカルシニューリンの関与については否定的見解も多く，その詳細は明らかでない。本研究では，ICR マウスを対象に後肢懸垂－再接地モデルを適用し，収縮活動量の増減に伴う骨格筋線維タイプおよび筋線維サイズの変化について，カルシニューリン系シグナル経路の関与を中心に検討した。8 週間の後肢懸垂により，ヒラメ筋における MHC I の減少および MHC IIb の新たな発現が認められ，著明な速筋化を示した。またその後 4 週間の再接地により , MHC isoform はコントロールレベルに回復した。一方，再接地期間中にカルシニューリン特異的阻害薬（FK506）を投与した場合, MHC isoform の回復は明らかに抑制された。筋線維サイズについても検討を加えたところ，8 週間の後肢懸垂により，ヒラメ筋の著明な筋萎縮が（速筋線維：47.8%，遅筋線維：20.7%）が認められた。また再接地期間中に FK506 を投与した場合，遅筋線維特異的な再肥大の抑制効果が認められた。カルシニューリン系シグナル経路の各因子の発現変化に関しても検討を行ったところ，後肢懸垂による骨格筋活動量の減少に伴いカルシニューリンの発現レベルは増大し，また NFAT2 および MEF2A に関しても，発現量の増加が認められた。以上の結果から，後肢懸垂－再接地過

程における筋線維タイプおよび筋線維サイズの制御機構において，カルシニューリン系シグナル経路が遅筋線維特異的な制御プログラムに関与することが示された。しかしながら，カルシニューリン系シグナル経路の各因子の発現変化に関して，活動量の減少に伴い発現レベル自体は増大していたことから，カルシニューリンが筋線維サイズや筋線維タイプの制御以外の機能を有する可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は，運動レベルの変化に伴う骨格筋の「構造と機能」の制御機構，特に遅筋線維特異的な遺伝子発現を制御するメカニズムとして，カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを含むシグナル経路の関与を中心に，マウスをモデル動物として検討が行われたものである。モデル実験動物と特異的阻害剤を活用して，カルシニューリンを中心としたシグナルカスケードが，運動に反応して機能している可能性を見いだしたことは，本論文の新しい知見である。

さらに Study 3 においては，廃用性運動モデルの後に使用性運動モデルを組み合わせることで，より臨床的事象を想定した検討が行われた。廃用による骨格筋萎縮や速筋化，またそれらに起因する疲労耐性の低下は，臨床医療現場においても極めて多く観察される現象であり，様々な疾病に共通する障害像でもある。これら廃用による骨格筋の組織変化，および運動によるその回復過程のメカニズム解明は，リハビリテーション医科学分野に対してもきわめて高い貢献が期待できる重要な論文として専門委員会で高く評価された。

「マウスで得られた知見をそのまま人に応用できるか？」という問題など，いくつかのアドバイスが出たが，これは現代のトランスジェニックマウスを用いた世界レベルでの研究体制の問題でもあり，今後の大きな課題ではあるものの，本論文の重要性を少しも損なうものではないと思われた。

よって，著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。